

Publication 1

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 02-076592

(43)Date of publication of application : 15.03.1990

(51)Int.Cl.

C12P 7/56

(21)Application number : 01-184839

(71)Applicant : RHONE POULENC CHIM

(22)Date of filing : 19.07.1989

(72)Inventor : SCHNEIDER DIDIER  
LAMONERIE HUBERT

(30)Priority

Priority number : 88 8810789 Priority date : 10.08.1988 Priority country : FR

**(54) PRODUCTION OF LACTIC ACID**

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To enable the hydrolysis of starch and at the same time the economical production of lactic acid by adding an amylose-hydrolyzing saccharifying enzyme into an aqueous nutrient medium containing starch as an assimilable carbon source and fermenting the mixture with microorganism.

**CONSTITUTION:** Drinking water is added to a starch such as wheat flour to prepare a suspension, and the suspension is liquefied by blowing steam into it. Subsequently, the resultant liquid is placed in a fermentation tank, and this is sterilized after adding a nitrogen source such as ammonium sulfate and other nutrients. Then, at least one of saccharifying enzymes such as glucoamylase is charged into the sterilized mixture to prepare a medium. Into the aqueous medium, a cultured body of *Lactobacillus lactis* ATCC 12314, which has been inoculated into a medium such as an MRS medium, is seeded, and the mixture is fermented to produce lactic acid. After the fermentation, the produced lactic acid is recovered from a fermentation tank, and it is purified by known methods such as filtration and solvent extraction. This process enables the production of lactic acid under the saving of time with the omission of a process, in which the starch is saccharified in advance, as well as at a low cost.

PF4314

[特許]2004-042464

[受付日]平成20.09.10

1/E

【書類名】 刊行物等提出書  
【提出日】 平成20年 9月 8日  
【あて先】 特許庁長官 鈴木 隆史 殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2004- 42464  
    【出願公開番号】 特開2004-248673  
【提出者】  
    【住所又は居所】 省略  
    【氏名又は名称】 省略  
【提出する刊行物等】 刊行物1：特開平2－76592号（公開日：平成2（1990）年3月15日）  
【提出の理由】  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 刊行物1：特開平2－76592号 写し 1

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-76592

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)3月15日

C 12 P 7/58

6926-4B

審査請求 有 請求項の数 11 (全6頁)

⑮ 発明の名称 乳酸の製法

⑯ 特 願 平1-184839

【添付書類】

⑰ 出 願 平1(1989)7月19日

6  176

優先権主張 ⑱ 1988年8月10日 ⑲ フランス(FR) ⑳ 8810789

⑳ 発 明 者 デイデイエ シュメデ フランス国, 79500-メル, リュ エロワ リカー  
ール, 7㉑ 発 明 者 ウベール ラモーヌリ フランス国, 79500-メル, リュ フゴードリー(番  
地なし)㉒ 出 願 人 ローヌーブラン シミ フランス国, 92408-クールブボワ, ケ ポール ド  
ウーメル, 25

㉓ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

乳酸の製法

## 2. 特許請求の範囲

1. 質化可能な炭素源として澱粉を含む水性炭素培地中の微生物を使用する菌群による乳酸の製法であって、少なくとも1つのアミロース加水分解酵素を付加的に存在させて発酵を行うことを特徴とする方法。

2. 澱粉を、液化したか、または部分的に糖化した状態で使用する、請求項1記載の方法。

3. 澱粉を生澱粉の状態で使用する、請求項1記載の方法。

4. 発酵培地が、糖化酵素に加えて液化酵素を含む、請求項3記載の方法。

5. 澱粉が、発酵培地に対するグルコースの重量比が0.9～18%となるのに必要な量存在する、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

6. 糖化酵素を、 $\alpha$ アミラーゼ、 $\beta$ アミラーゼ、グルコアミラーゼ、インアミラーゼ、プルランナー

ゼおよびこれらの混合物から選ぶ、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

7. 糖化酵素を、乾燥状態で測定した澱粉1gに対して0.04～2酵素活性単位となるのに十分な量使用する、請求項1～6のいずれかに記載の方法。

8. 糖化酵素がグルコアミラーゼであり、かつ澱粉に含まれる固体の重量に対して0.02～1%である量を使用する、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

9. 微生物を、Lactobacillus属、Streptococcus属、Pedococcus属、Bacillus属、およびSporofactobacillus属に属する微生物、ならびにRhizopus属に属する真菌から選ぶ、請求項1～8のいずれかに記載の方法。

10. 発酵をpH3.0～8.0で行う、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

11. pHを、アルカリ金属、アルカリ土類金属またはアンモニウムの水酸化物または炭酸塩から選ぶ添加剤によって制御する、請求項10記載の方

(1)

(2)

特開平 2-76592(2)

法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物によって炭水化物を醗酵させる乳酸製造の改良方法に関する。さらに、特定すれば澱粉から由来する糖類の転化による微生物学的方法に関する。

適切な微生物を存在させて、糖類を醗酵させる有機酸の合成は世界的に周知の方法である。このような微生物による醗酵で得られる典型的な酸としては、たとえば酢酸、乳酸、くえん酸、グルコン酸、2-ケトグルコン酸、フマル酸、およびイタコン酸がある。これらの酸は食品、医薬品、化学製品およびその他の工業で用いられる。その製法はたとえばS. J. Gutcho-Woyes Data CorporationのChemicals by Fermentation, 1973に記載されている。

工業的醗酵において、基質の炭水化物は、使用の容易さ、価格および高収率を得る可能性を同時に考慮して選択する。澱粉は、容易に得られる炭水化物として、しばしば考慮された。しかし、すべ

ての微生物は、大部分がデキストロースを代謝するのに、澱粉を代謝することができない。その結果、澱粉は醗酵前に加水分解して糖化しなければならないので、製造原価を高めている。

本発明の主要な目的は、栄養源として澱粉を使用し、グルコースまたはグルコース含量の多い澱粉の加水分解生成物の収率と少なくとも等しい収率で、経済的に醗酵させる方法を提案することである。

微生物を使用して、澱粉を酵素的に加水分解すると同時に、醗酵させて乳酸を合成できることを発見した。これによって、澱粉を予め糖化する工程の省略による時間の短減の他に、醗酵条件のpHおよび温度が、加水分解酵素の最適活性条件と異なっても、酸の生成速度がグルコースを基質とする場合に比べて悪影響を受けないことは予想外なことであった。

本発明による、養化できる炭水化物として澱粉を含む水性栄養培地を微生物によって醗酵させる乳酸の製法は、少なくとも1つのアミロース加水分解

(3)

解糖酵素を加えて、醗酵させる。

本発明によって炭水化物として使用する澱粉は、小麦、トウモロコシ、高粱、米、タピオカ、裸麥、燕麥のような穀類の澱粉、または馬鈴薯のような塊茎の澱粉でもよい。澱粉は生澱粉のままか、または液化したか、または特に糖化した形で使用する。

本明細書において、述語「澱粉」は、生澱粉の水懸濁液、澱粉の不完全な加水分解生成物、たとえば液体化（液化）した澱粉、澱粉のシロップ、およびデキストロースに富む加水分解生成物を含む。澱粉の加水分解生成物は、加水分解の程度

によって多様であり、この程度はデキストロース当量 D.E. およびオリゴサッカライドおよびさらに高糖なポリサッカライドのデキストロース含量で表される。液体化澱粉はD.E. 約3-20を示し、一般にポリサッカライド50-95%を含み、醗酵度がグリコース単位G7を超える。澱粉のシロップ、またはデキストロース当量の低いグルコースのシロップは、D.E. が約20-88を示し、G7を超える

(5)

(4)

ポリサッカライドが10-50%である。澱粉の加水分解生成物またはデキストロースに富むシロップは、D.E. が90-98%に達する。澱粉の加水分解生成物の製造は、当業界でよく知られている。通常液化澱粉および澱粉シロップは、液化のαミラーゼ、時にはβミラーゼによって酸性加水分解および/または酵素加水分解によって得られる。

グルコースに富む加水分解生成物を得るには、2工程による澱粉の炭化、すなわち炭化のαミラーゼの作用、次に糖化酵素たとえばアミログルコシダーゼの名でも知られているグルコアミラーゼの作用によることも多い。

本発明の方法の実施において、澱粉シロップ、特に液化された澱粉を使用することが好ましいグルコースに富む加水分解生成物の使用は、経済的に見地から有利でない、それはアミログルコシダーゼの最適活性条件の50℃を超える温度、およびpH 4.5-5.5においてさえ、長時間を要する予備糖化工程を含むからである。

澱粉およびその加水分解生成物は、精製しない

(6)

特開平 2-76592(3)

まま、滅菌した後に、本発明の方法に直接使用することができる。また精製され、濃縮または脱水された市販の製品、たとえばマルトデキストリンも使用できる。

澱粉は、醗酵培地中で、グルコース対醗酵培地の重量比が約0.9~18%となるように存在させる。生澱粉は、乾燥状態として、醗酵培地に対して約10~200 g/ℓ、好ましくは60~160 g/ℓとする。

本発明によって、イタコン酸生成微生物を含む醗酵培地に加える、アミロース分解糖化酵素は、澱粉のデキストリンをグルコースおよびマルトースに変換することができる。糖化酵素として糖化αアミラーゼたとえば*Bacillus subtilis* var. *amylolaccaritiens*、酸性αミラーゼ、βアミラーゼ、グルコアミラーゼ、インアミラーゼ、ブルナーゼを挙げることができ、これらの酵素は単独または混合して使用することができる。

グルコアミラーゼは特性が優れているので好ましい。グルコアミラーゼはすべての酸性グルコ

ミラーゼ、たとえば*Aspergillus*, *Endomyces* または *Rhizopus* とすることができる。炭素源として特に生澱粉を使用する場合は、糖化酵素、たとえば液性αアミラーゼとβアミラーゼ、または液性αミラーゼとグルコアミラーゼの混合物に加えて液性酵素を使用することができる。酵素の工業的な製造方法は *Encycl. of Pol. Sc.* Vol. 6, p46-53 に記載されている。

アミロース加水分解糖化酵素、液性酵素であってもよいが、これを澱粉の糖化、または液化に必要な量として醗酵培地に加える。最少使用量は酵素の活性度、培地中に存在する澱粉の0.2の値の関数であり、当業者によって容易に決定することができる。一般的には、乾燥状態で測定した澱粉1gに対して、酵素活性度0.04~2単位、好ましくは0.1~1単位を与えるのに十分な量を使用する。糖化酵素として *Novo Industry* が市販する登録商品名 *AMG 200L* グルコアミラーゼは、醗酵培地中に存在する液化された澱粉に含まれる固体の重量にもとづいて、0.02~1%、好ましくは0.05~

(7)

(8)

0.5%を加えることができる。

本発明の方法は、糖の存在においてD-またはL-乳酸を生成できれば、どのような微生物でも使用することができる。特に *Lactobacillus* 属たとえば *L. delbrueckii*, *L. lactis*, *L. Leichmanii*, *L. bulgaricus*, *L. jugurt*, *L. casei*, *L. italicus*, *L. plantarum*; および *Streptococcus* 属たとえば *S. thermophilus*, *S. faecium*; および *Pediococcus* 属たとえば *P. pentosaceus*、ならびに *Bacillus* 属、*Sporolactobacillus* 属および真菌たとえば *Rhizopus orizae* を挙げるることができる。

本発明で使用するアミロース分解酵素および炭素源の他に、製造培地および醗酵条件を文献の記載から選ぶことができる。便宜の製造培地はたとえば前記 *Chemicals by Fermentation* の他、多くの特許たとえば米国特許A-3 125 494、フランス特許A-1 356 847、欧州特許A-69 291、欧州特許A-72 010、欧州特許A-113 215、米国特許A-4 564 594 に記載されている。

炭素源は、同化可能な無機および有機化合物、

たとえば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、りん酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、トウモロコシ(CSL)および/または大豆の可溶性抽出物、尿素、ビール酵母、ペプトン、魚たんぱく分解生成物などおよびこれらの混合物を使用することができる。培地は、無機塩類たとえばCa、Mg、Na、K、Fe、Ni、Co、Cu、Mn、Znの硫酸塩、塩化物、りん酸塩、の他に、ビタミン、また従来の添加剤、たとえばpH制御剤および/または発泡防止剤を含むことができる。

微生物は、周知のように接種物または中間培養物として醗酵培地中に導入する。

アミロース分解酵素は、接種直前に滅菌した培地に加えることが好ましい。醗酵はpH約3.0~8.0、好ましくは5.0~7.0、温度約20~50℃として適宜行うが、最適条件は使用する微生物の特殊な菌株によって定める。*Lactobacillus lactis* を使用すると、pH5.5~6.0、温度約35~45℃で乳酸の収率を上げることができる。媒質のpHを調節する中和剤は、アルカリ金属の水酸化物または

(9)

(10)

## 特開平 2-76592(4)

炭酸塩、アルカリ土類金属のアンモニウム塩から選り、接種の前、または醗酵の全工程において、連続的に導入することができる。

醗酵させた後、生成した乳酸を醗酵槽から回収し、周知の方法、たとえば濾過、濃縮、結晶化、または溶媒抽出によって精製することができる。

下記の説明は、穀粉から由来する炭水化物源を含む培地に、穀粉またはその加水分解生成物であるモノまたはポリサッカライドを加水分解することができる酵素を存在させて、微生物によって醗酵させて乳酸を製造する特殊な方法を意図するものであるが、本発明の醗酵培地の正確な組成または特殊な実施方法を限定するものではない。

次の実施例によって本発明を例示する。

## 例 1

## (a) 炭酸化された生穀粉の製造

容量50ℓの醗酵槽に、小麦穀粉(Ets ROQUETTE) 6.75kgを導入した。飲料水を攪拌しながら加えて全固体を20ℓの懸濁液とした。懸濁液はH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>でpHを6.5に調整し、熱安定性αアミラーゼ(登録

商標 TERNAMYL 120L-NOVO Industry)を含む醗酵調整物3.65mlを加えた。30分間蒸気を吹込んで温度100℃で穀粉懸濁液を炭酸化した後、周囲温度に冷却した。

## (b) 醗酵

炭酸化した穀粉を含む醗酵槽に、濃縮トウモロコシ(CSL)の洗浄水1.750kg、魚たんぱく加水分解生成物0.270kg、りん酸25mlを導入した。混合物に飲料水を加えて27ℓとした。この溶液を攪拌し、NaOHでpHを6.0に調整し、1時間蒸気を吹込んで100℃で滅菌した。

付属の滅菌槽で、炭酸カルシウム4.2kgを飲料水13ℓに希釈した。この溶液に蒸気を1時間30分吹込んで攪拌し、冷却した後、醗酵槽に滅菌状態で移した。温度を40℃に調整した。グルコアミラ

ーゼ(登録商標AMG 200L-NOVO Industry)を含む醗酵調整物15.6mlを注入した。この培地に、予め培地WRS(Nilieu de De Man, Rogosa et Sharpe-参照番号0881-01 de DIFCO)に接種したLactobacillus lactis ATCC 12314の培養体1.7ℓを接種

(11)

(12)

した。醗酵培地は、最終的に50ℓとし、40℃の滅菌蒸気の雰囲気中で攪拌し、滅菌した。

醗酵は45時間継続した。

D-乳酸123.3gを得、生産性は2.74g/ℓ/hであった。

## 比較例 2~4

例1(b)に記載のように、同一のLactobacillus lactis ATCC 12314培養物を使用した。グルコアミラーゼを存在させずに、一連の醗酵を行った。炭酸源は下記のように構成した。グルコース水和物8.50kg(例2)、穀粉加水分解生成物9.150kg(Ets ROQUETTE市販の74966)、乾燥状態の含有70%、D.E.約96~98(例3)、例1記載の条件で炭化した生穀粉6.75kg(例4)。

各例において醗酵培地の最終体積は50ℓとした。

醗酵時間および生産性を第1表に示す。

各例1~4の工程において、醗酵液の試料を定期的に採取して、高速液体クロマトグラフィーによって乳酸の含量を測定した。その結果を第1表のグラフに示す。曲線1~4は、醗酵培地中のg

(13)

/ℓで表わした乳酸の生産量Qを、醗酵時間(h)で表わした熟成の関数として各例1~4について示す。

## 例 5・6

下記条件が異なる他は、例1と同一の培養物を使用して例1と同一の条件で2つの醗酵を行った。

	例 5	例 6
αアミラーゼで炭酸化した穀粉	6.50kg	7.25kg
グルコアミラーゼ	15.0ml	16.7ml
CaCO <sub>3</sub>	4.0kg	4.5kg

結果は第1表に示す。

(14)

特開平 2-76592(5)

## 第 1 表

## D-乳糖

例	炭 素 源			グルコ アミ ラーゼ mg / L	窒 素 源			塩形成剤	生成した 乳糖 g / L	醗酵時間 (h)	生産性 g / L / h
	グルコ ース g / L	炭粉加水分解 生成物 (1) g / L	炭 粉 g / L		CSL (2) g / L	魚たんぱく加水 分解生成物 g / L					
1			135	0.312	35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	123.3	45	2.74	
2	130				35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	121	85	1.42	
3		183			35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	121.3	107	1.13	
4			135		35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	91.5	65	1.40	
5			130	0.30	35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	113	40	2.82	
6			145	0.337	35	5.4	CaCO <sub>3</sub>	134.6	60	2.24	

(1) グルコース含量 71%

(2) CSL=トウモロコシ浸出液(濃縮トウモロコシ洗浄水)

(15)

## 例 7 L+乳酸の製造

例 1 記載の条件で液化したトウモロコシ炭粉 7 kg を含む醗酵槽に、濃縮小麦洗浄水 1.750 kg、魚たんぱく加水分解生成物 0.270 kg、りん酸 25 ml を加えた。この混合物を飲料水で 27 L に希釈して攪拌し、NaOH で pH を 6.0 に調節し、蒸気を 1 時間吹込んで滅菌した。

炭酸カルシウム 4.35 kg を含む滅菌水溶液 16 L を加え、温度を 40℃ に調節した。この培地にグルコアミラーゼ(登録商標 AMG 200L-NOVO Industry)を含む酵素調製物 16.1 ml を加え、予め MRS 培地に接種した *Lactobacillus casei* IFO 3425 培養物 1.7 L を接種した。

醗酵培地は最終的に 50 L とし、40℃ の滅菌した窒素雰囲気中で攪拌し、熟成した。

L+乳酸の含量は高速液体クロマトグラフィーで周期的に測定した。

醗酵熟成時間 (h)	20	40	60	80	107
L+乳酸濃度 (g / L)	21	47.5	66	93	120.2

(16)

## 例 8 ~ 11

容量 50 L の醗酵槽に炭粉 6 kg を導入した。飲料水を攪拌しながら加えて懸濁させ、全液量を 27 L とした。

炭粉懸濁液の pH を H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で 6.5 に調節し、これに熱安定性 α-アミラーゼ(登録商標 TERMAMYL 120L-NOVO Industry)を含む酵素調製物 3.25 ml を加えた。

炭粉懸濁液は次に、蒸気を 30 分間吹込んで 100℃ に加熱して沈体化した。

沈体化した炭粉溶液を冷却し、トウモロコシ浸出液 1.750 kg、魚たんぱく加水分解生成物 0.270 kg、りん酸 25 ml を加えた。飲料水を加えて 38 L に調節し、NaOH で pH を 6.0 に調節した。

得られた溶液に、蒸気を 1 時間吹込んで 100℃ で滅菌した。この工程の最後に、40℃ に冷却し、体積は 50 L であった。

この培地に、グルコアミラーゼ(登録商標 200L-NOVO Industry)を含む酵素調製物 13.8 ml を加え、MRS 培地中に適宜接種した *Lactobacillus lactis*

(17)

特開平 2-76592(6)

ATCC 12314の予備培養物1.7gを接種した。

この調製物を攪拌し、滅菌した空素雰囲気中で40℃で熟成した。

塩形成剤として $\text{NH}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{OH}$ 、 $\text{NaOH}$ または $\text{KOH}$ を例8～11にそれぞれ加えてpHを自動的に6.0に調整した。

D-乳酸の含量を高速液体クロマトグラフィーによって測定して、次の結果を得た。

培養熟成時間 (h)	25	50	75	85	90
D-乳酸濃度 (g/l)					
例8 ( $\text{NH}_3$ )	39	76	88	101.8	102.3
例9 ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )	35	71	91	93.5	94.5
例10 ( $\text{NaOH}$ )	30	68	87	89.9	
例11 ( $\text{KOH}$ )	31	71	86	93.3	

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は例1～4における熟成時間と乳酸濃度との関係を示すグラフである。

(18)

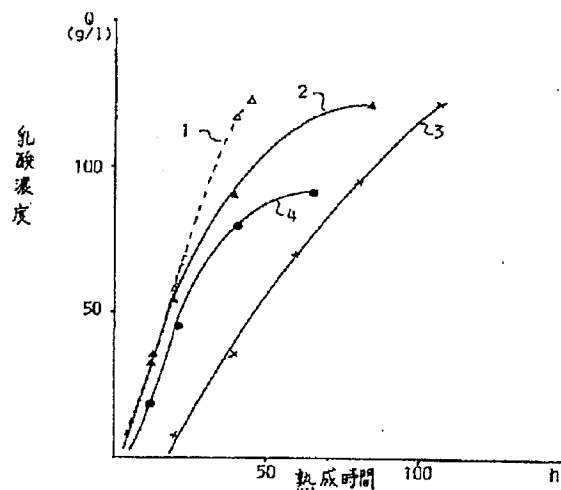


FIGURE 1